

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018730

International filing date: 15 December 2004 (15.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-420510
Filing date: 18 December 2003 (18.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

12.1.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 8 日
Date of Application:

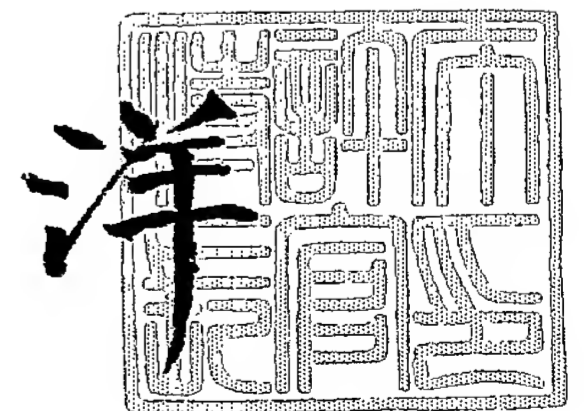
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 0 5 1 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 0 5 1 0]

出 願 人 株式会社日立メディコ
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 0 月 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 9 6 0 5

【書類名】 特許願
【整理番号】 03528
【提出日】 平成15年12月18日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/02
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区内神田1丁目1番14号
 株式会社日立メデイコ内
 【氏名】 鈴木 力
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区内神田1丁目1番14号
 株式会社日立メデイコ内
 【氏名】 猪俣 博
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区内神田1丁目1番14号
 株式会社日立メデイコ内
 【氏名】 小森 義広
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区内神田1丁目1番14号
 株式会社日立メデイコ内
 【氏名】 立久井 宏
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町502番地
 株式会社日立製作所 機械研究所内
 【氏名】 渡部 成夫
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都国分寺東恋ヶ窪一丁目280番地
 株式会社日立製作所 中央研究所内
 【氏名】 小沢 理
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県日立市城南町2-1-1
 株式会社日立製作所 日立総合病院内
 【氏名】 岡 裕爾
【発明者】
 【住所又は居所】 名古屋市東区白壁4-9-2
 【氏名】 上田 実
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県水戸市吉田町991-5
 【氏名】 野村 靖
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市津田2714
 【氏名】 進藤 勲夫
【特許出願人】
 【識別番号】 000153498
 【氏名又は名称】 株式会社日立メデイコ
 【代表者】 猪俣 博
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008383
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】

特許請求の範囲 1

【物件名】

明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

細胞を培養する培養器、該培養器を回動させる駆動手段、未使用の薬品を入れたりザーブタンク、使用後の薬品を入れる廃液タンクからなり、上記培養器と上記リザーブタンクの間または上記培養器と上記廃液タンクの間のうち少なくとも一方の間を部分的に変位可能な管部材で接続したことを特徴とする細胞培養装置。

【請求項 2】

上記回動動作には回転動作を含み、上記培養器は略円形状に形成され、上記回転動作の中心と上記培養器の中心が一致しないことを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養装置。

【請求項 3】

細胞培養装置と、制御監視装置が双方向データ通信手段により接続され、制御監視装置は予め設定した培養標準条件から逸脱した培養状態を検出した場合に外部に異常を知らせる信号を発し、かつ異常を起こした細胞培養器を外部に認識せしめる表示手段を備えたことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の細胞培養装置。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養装置

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、細胞培養装置に係り、特に、接着依存性細胞に適用して好適な培養操作を自動的に行う細胞培養装置に関する

【背景技術】

【0 0 0 2】

細胞培養は、培養器内の培地の交換や、細胞密度を適正にするための再播種などといった煩雑な継代プロセスが手作業により行われている。通常これらの作業は、コンタミネーションなどの発生を回避するため、半導体製造分野で培われたクリーン環境生成技術により大気中の浮遊微粒子濃度を抑制した比較的清浄な雰囲気で行われる。しかし、この清浄な雰囲気でもコンタミネーションを回避するには十分ではなく、培養器として通常用いられる円形シャーレで細胞を培養する場合、培地交換の際にはシャーレの蓋を持ち上げるように上方にかざして菌が混入しないよう注意を払いながら、ピペッタをシャーレとその蓋のすきまに、かつピペッタがシャーレの縁など周囲のものに触れないようすばやく挿入するといったように煩雑で難しい作業を必要としていた。このような作業は、頻繁かつ日常的に行われ、通常非常に熟練した作業者が行う。

【特許文献 1】 USP5,985,653

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

上記のように培養作業は、煩雑にもかかわらず手作業で行われているのが現状であり、また、熟練作業を必要とするものであるため、容易に実施し難いものであった。

【0 0 0 4】

特に、近年、再生医療用の技術開発が盛んに行われているが、組織を構築するための幹細胞の培養などといった場合、培養した細胞は被検者に移植されるので、培養中の異物混入（コンタミネーション）の可能性は0%を保証しなければならない。しかしながら、上記クリーン環境生成技術は、大気中の浮遊粒子濃度を抑制するものであって、様々な規格（日本工業規格など）によって、その濃度許容値に応じクラス分類されるが、その環境内には様々な電気や機械類の部品が配されるのが普通であり、実質的に微粒子の数0ヶを保障することは極めて難しい。細胞培養などに要求されるコンタミネーション回避のための要件は、細胞に混入する生きた菌の数を0ヶとすることであり、たとえ1ヶの微粒子であってもそれが菌であればコンタミネーションを引き起こす。このように、クリーン環境生成技術はリスク低減には有効ではあるが、コンタミネーション回避を確実化できないという課題があった。また、複数の被検者細胞を距離的に近い、具体的には1つの部屋で培養を行うことは、クロスコンタミネーションの点でもリスクが高くなる。何らかの要因で被検者の細胞が菌類（例えばカビ）が混入してコンタミネーションをおこした場合、胞子が拡散し他の被検者細胞に伝染する可能性を捨て去ることは困難である。たとえば、特許文献1では、播種の均一化のために揺動手段が備わった培養装置を開示するが、完全に閉鎖されてはいないため、コンタミネーションのリスクが残っていた。

以上のように細胞培養作業は、量産化と安全性の両立化の点で大きな課題を有していた。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

本発明の細胞培養装置は、細胞を培養する培養器、該培養器を回動させる駆動手段、未使用の薬品を入れたりザーブタンク、使用後の薬品を入れる廃液タンクからなり、上記培養器と上記リザーブタンクの間または上記培養器と上記廃液タンクの間のうち少なくとも一方の間を部分的に変位可能な管部材で接続したこと細胞培養装置を提供することにより上記課題を解決する。

このように構成することにより、例えば培養器とリザーブタンクと廃液タンクを予め接続してガンマ線などによる滅菌処理後、その接続を外さずに培養に供することができるので培養中は直接外気が混入することがなくなり、コンタミネーションのリスクは皆無となる。なお、培養器とリザーブタンクと廃液タンクを予め接続せずに培養直前に接続する場合、無菌で管部材を接続する手法は医療現場において普及しているので、この手法を適用しても本発明の意図から外れることなく、目的を達成できる。

【0006】

また、前記管部材を可撓性チューブとすることで、培養器を駆動手段により稼動することができ、これによって、培養中の培地の攪拌や、細胞を均一密度で再播種することが可能となる。

また、培養細胞を観察する観察手段を備え、前期駆動手段は培養器内の細胞密度を勾配状態にさせる駆動手段であって、前記観察手段は前記培養器の特定部分を観察する手段を備える。これにより、細胞が増殖しコンフルエントを向かえたか否かの判断を画像にて実施する場合において、培養器全体を画像スキャンする必要がなくなり特定の部分のみ観察することで判断ができるようになる。コンフルエント後に行う継代処理に迅速に移ることができ、また装置の簡素化に有効となるので好ましい。

【0007】

また、上記回動動作には回転動作を含み、上記培養器は略円形形状に形成され、上記回転動作の中心と上記培養器の中心が一致しない。これにより、培養器内の培地にスムーズな流れを形成することができ、これにより継代時に細胞が均一に再播種できるようになる。

また、前記回動動作に往復回転動作を含み、細胞が注入中は該往復回転動作を継続することにより、継代時の播種密度は前記よりさらに均一になる。

また、前記培養器を多層構造化することにより、培養器は小型になり、これに伴いコンタミネーションのリスクは一層軽減できる。

また、培養器は管部材により接続された複数の培養器で構成する。これにより、簡易的に培養器は小型にできるのでコンタミネーションのリスクは一層軽減できる。

【0008】

また、前記培養器の少なくとも片側面に反射鏡を有した複数の光路変更手段を設ける。これにより、上記のように培養器が管部材で複数個接続された場合であっても、観察手段は画像を取得できる。

また、前記培養器に磁性金属体を備え、培養器外部に磁石を備える。これにより回動動作に伴い培養器内部の磁性金属は移動し、培地は攪拌されるので、前記継代時の播種密度は前記よりさらに均一になる。なお、前記培養器に磁石、培養器外部に磁性金属を備えてもよい。

また、前記培養器に細胞を投入後、所定時間経過した後に培地を所定量まで排出するプロセスを備えたことを特徴とすることにより、多量の培地で薄められた細胞懸濁液は細胞が接着するまでその状態を維持し、接着状態になると培地が適量まで排出される。これにより細胞は均一に播かれる。

【0009】

また、加工前細胞が入れた容器から細胞を注出する細胞注出手段と、注出された細胞を培養器に送液する第1の細胞送液手段と、培養器を回動する回動手段と、未使用薬品を収納したリザーブタンクと、上記培養器とリザーブタンクを接続する第1の管部材と、上記リザーブタンクから上記培養器に薬品を注入する薬品送液手段と、仕様済み薬品を収納する廃液タンクと、該廃液タンクと上記培養器を接続する第2の管部材と、上記培養器から廃液タンクに廃液を送液する廃液送液手段と、上記培養器から培養加工後の細胞を容器に注入する加工後細胞送液手段とを備える。これにより、培養すべき細胞の投入から、培養後の細胞の取得まで、全てのプロセスが自動化でき、作業者は煩雑な作業から解放され、かつコンタミネーションの防止もできる。

【0010】

また、細胞培養装置と、制御監視装置を双方向データ通信手段により接続し、制御監視装置は予め設定した培養標準条件から逸脱した培養状態を検出した場合に外部に異常を知らせる信号を発して、かつ異常を起こした細胞培養器を外部に認識せしめる表示手段を備える。これにより、作業者は培養装置から離れた場所から細胞培養装置の培養状況を把握できるようになる。

【0 0 1 1】

また、細胞培養装置と、制御監視装置が双方向データ通信手段により接続され、上記細胞培養装置と上記制御監視装置の通信を無効にする手段と、上記細胞培養装置が単独で動作するメンテナンスモード制御器を備える。これにより、作業者は細胞培養装置のメンテナンスをする場合、制御監視装置の動作を気にせずに自らの判断でメンテナンスができるようになり、また制御監視装置側からの指令により不意な動作ができなくなることから、作業者に対する安全性も向上する。

【発明の効果】

【0 0 1 2】

本発明によれば、以下の効果を奏する。

- (1) 密閉構造によりコンタミネーションは回避され、また1試料は1つの密閉系にて処理完了するのでクロスコンタミネーションも回避される。
- (2) 培養器を回動することにより、従来の手作業による培養法と同様に攪拌や均一化が可能となる。
- (3) 細胞が増殖しコンフルエントを向かえたか否かの判断を画像にて実施する場合に、培養器全体を画像スキャンする必要がなく、特定の部分のみ観察して判断できる。これにより、継代処理の迅速化、装置の簡素化が可能となる。
- (4) 継代時に回転動作を伴うことにより細胞が均一に再播種できるようになる。
- (5) 細胞培養操作の全自動化が可能となる。
- (6) 異常時において、操作者に異常を知らしめることができる。
- (7) 保守時に、細胞培養装置を他からの指示なくして動作できるので、保守が容易になる。また、不意に動作することがなくなるので、安全性が向上する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0 0 1 3】

以下、本発明を適用してなる細胞培養装置の実施形態について図1及至図13を参照して説明する。

(実施例 1)

図1は本発明を適用してなる細胞培養装置の概略構成を示すブロック図である。1は培養器であって、この培養器1はポンプ3を介して未使用の薬品が注入されたりザーブタンク4と可撓性管部材2により接続している。7は使用済みの薬品を貯める廃液タンクであり、ポンプ6を介し前記培養器1とは可撓性管部材5により接続している。8は培養器1を回動させるための駆動手段である。

9はカメラ、10は光源であり、培養器1中の培養細胞を観察する。システムコントローラ11は、ポンプ3、ポンプ6、駆動手段8、カメラ9、光源10に接続し、これらポンプ3、ポンプ6、駆動手段8、カメラ9、光源10を制御する。

【0 0 1 4】

図2は本発明を適用してなる細胞培養装置の機構部の詳細図であり、図1におけるシステムコントローラ11を省いた実際の構成を示している。38は培養器である。培養器本体15の表面にはガス透過膜16を貼っている。培養器38は非毒性の材質で形成されていることが望ましく、ポリスチレン製が好ましい。

なお、特に表面は細胞が付着しやすいように親水性を持つように改質されていると良い。培養器38の略中央には薬品注入のためのチューブ接続部材19を設け、培地などの薬品を培養器38内部に流し込む。この時、傾斜部381が各種液体の落下の衝撃を和らげて培養細胞へのダメージを防いでいる。17は培地を示す。

【0 0 1 5】

培養器38の底面には細胞が接着し、培養される。チューブ接続部材18は細胞の老廃物が溶出し、培地中の栄養素が少なくなった古い培地を排出する排出口である。培養器38は、ロータ22上に固定され、このロータ22は下方にてカムフォロア27にて矢印E方向に回転できるように、たとえば円周方向3箇所自在に支持される。さらに、ロータ22の下方にはインターナルギア（図示せず）を形成し、このギアは、フレーム30に固定した培養器駆動モータ29の出力軸に勘合したピニオン28と噛みあう。25はケーブルドラムであり、ロータ22に設けたピンチ弁24の配線を巻く。26は巻き取りドラムであり、ロータ22が回転しても上記配線を巻き取り、配線が緩むことにより、他の突起物に絡まないように自動的に配線を巻き取るようになっている。

例えば、ばねを利用し定常的にケーブルに張力を与えることで実現できる。

【0016】

21は供給チューブであり、チューブ接続部材19に接続している。35は供給チューブ21をガイドするガイド部材であり、この供給チューブ21はガイド部材35の上方に設けたチューブ固定部材36にて固定され、このチューブ供給部材36からチューブ接続部材19間のチューブは、ガイド部材35の内部にて自由に動くようになっている。

【0017】

67は未使用の培地を入れた培地タンク、68は緩衝液を入れた緩衝液タンク、69、70、71は細胞剥離剤を入れた細胞剥離剤タンクである。72、73、74、75、77は、各タンク67、68、69、70、71からの送液を制御するピンチ弁である。また、76は後述する培養前細胞の注入を制御するピンチ弁である。79、78はチューブ内の液溜まりを防止する空気流入口であり、大気中の不純物を取り除くためのフィルタを備えている。各タンク67、68、69、70、71からのチューブは前述した供給チューブ21に接続され、しごきポンプ37（ローラでチューブを挟み込み、ローラを移動することにより送液するポンプ）で送液できるようになっている。

【0018】

廃液チューブ23は前記チューブ接続部材18に接続し、ガイド部材99によりガイドされる。このガイド部材99の下部にはチューブ固定部材100を設けてチューブを固定し、かつこのチューブ固定部材100とチューブ接続部材18間では廃液チューブ23は自由に動くようになっている。細胞の老廃物が溶出し、培地中の栄養素が少なくなった古い培地は、しごきポンプ101により廃液チューブ23を通して廃液タンク102に貯める。103はピンチ弁であり、廃液タンク102への送液を制御する。104は、廃液をしごきポンプ101で送液する際、送液を制御するピンチ弁である。

【0019】

フレーム30に設けたシャッターモータ50は、シャッター51とワイヤで繋ぐ。シャッターモータ50の制御によりシャッター51は矢印A方向に移動できるようになっている。培養前細胞を入れた容器52はホルダー62で支持し、ホルダー62は送りねじを有したモータ63により矢印B方向に移動できるようになっている。容器52の上面はゴム材にてカバーしている（図示略）。53は針であり、細胞注入チューブ56と接続し、ピペッターアーム55に固定する。ピペッターアーム55は軸54に支持され、ピペッター回転動モータ57により矢印D1方向に回転できるようになっている。回転部材58は軸54と共に回転する部材で、ピペッター上下動モータ59とプーリ60を備えている。ピペッター上下動モータ59の出力軸に固定したプーリと上記プーリ60はベルト61により連結し、ベルトの一部は前記軸54と固定されている。

【0020】

ピペッター上下動モータ59の駆動により軸54は上下動作するようになっている。66は、培養前細胞をしごきポンプ37で送液する際、送液を制御するピンチ弁である。なお、39はピペッターアーム55に固定された針であり、一端にはエアフィルター40が設けられる。この針39の機能は、容器52が硬質のプラスチック材料で形成された場合において、内部が印圧になって細胞が吸引しにくくなるのを防止する。なお、培養前細胞はしごきポンプ37により吸引されると説明したが、針39から容器52に空気を圧送し、送液するようによい。

【0 0 2 1】

フレーム30に設けたシャッターモータ81は、シャッター82とワイヤで繋ぐ。シャッターモータ81の制御によりシャッター82は矢印F方向に移動できるようになっている。培養後細胞を入れる容器84はホルダー93で支持し、ホルダー93は送りねじ95を有したモータ94により矢印G方向に移動できるようになっている。容器84の上面はゴム材にてカバーしている（図示略）。83は針であり、細胞注入チューブ84と接続し、ピペッタアーム85に固定する。ピペッタアーム85は軸87に支持され、ピペッタ回転動モータ88により矢印D2方向に回転できるようになっている。回転部材89は軸87と共に回転する部材で、ピペッタ上下動モータ90とプーリ91を備えている。ピペッタ上下動モータ90の出力軸に固定したプーリと上記プーリ91はベルト92により連結し、ベルトの一部は前記軸87と固定している。ピペッタ上下動モータ90の駆動により軸87は上下動作するようになっている。103は、培養後細胞をしごきポンプ101で送液する際、送液を制御するピンチ弁である。なお、41はピペッタアーム55に固定された針であり、一端にはエアーフィルター42が設けられる。この針39の機能は、容器84が硬質のプラスチック材料で形成された場合において、内部が陽圧になって細胞が吐出しにくくなるのを防止する。なお、培養後細胞はしごきポンプ101により送液されると説明したが、培養器38に空気を圧送し、送液するようにしてもよい。

【0 0 2 2】

34は光源、31はレンズを備えたCCDカメラ、33はフィルターであり、培養器38にて培養する細胞の観察や、継代時のタイミング判定に利用する。光源34は、画像の輝度ムラを防止するため複数のLEDをフラットに配置したタイプが好ましいが、光量が十分であるならば1つのLEDもしくはランプでよい。また、フィルター33はCCDカメラ31に入射する光量を低減するためNDフィルター、及び細胞観察に適したコントラストを得るため適当なバンドパスフィルターを入れるとよい。このフィルターはCCDカメラの前面に設けても良い。NDフィルターはCCDカメラ31の前面に、またバンドパスフィルターは細胞に害を与える短波長光をカットするもの場合は光源34の前面の方が好ましい。32は観察窓である。108はフレーム30内部を一定温度に保つヒータであり、106は温度センサである。65はフレーム30内の空気を攪拌するファンである。96, 97は全体を床面に立設させるスタンドである。107は二酸化炭素と窒素と酸素の割合を制御した混合気体を供給する不純物を除くためのフィルターを備えた継ぎ手である。

【0 0 2 3】

上記の説明において、培養器38の上面に貼ったガス透過膜16は、全面を覆うように図示したが、部分的に設けてもよい。なお、培地の蒸発を防止するため、フレーム30内部の湿度を上げた方がよいのは言うまでもない。この場合、水を入れたトレーを内部に配置するのが容易である。培養器38の前面にガス透過膜で覆わない場合は、上記混合気体を直接培養器38内部に供給してもよいし、また培地などに溶け込ませても良い。

また、フレーム30は、概ね全体を覆う形体としたが、培養器38の周辺部分のみ覆う構造としても良い。すなわち、前述した2組のピペッタはフレーム30の外部に配置しても良い。

【0 0 2 4】

図3は図2の培養器38の詳細を説明する詳細図である。

(a) は平面図、(b) は側断面図である。図3 (a) において、培養器38の円中心と、回転中心はずれて配置（距離L1）している。古い培地を排出するチューブ接続部材18や堰20の位置と形状は、112, 113, 114のようにしても良い。

112, 113, 114は、培養器38の回転に伴い遠心力によりくぼみに細胞が凝集することがあり、この点では114の方がより好ましい。なお、このチューブ接続部材18の位置は培養器38のどこに位置してもよく、特に限定はしない。距離L1も特に限定しない。ただ、培養器38の円中心と回転中心はずらした方が細胞の均一播種の点で好ましい。チューブ接続部材18の位置は、たとえば培養器38の中心付近に配置することによっても細胞の凝集は避けられる。

【0 0 2 5】

ここで回転とは、回転、偏心回転、平行移動、往復平行移動のうち少なくとも一つとそれらの組み合わせを含み、特に細胞や液の攪拌や均一化に有用な動作である。例えば、培地や中和済み細胞剥離剤の培養器からの排出は、培養器を傾斜動作させても良い。また、培養器内の細胞の均一播種は、培養器を振動させてもよい。手作業による細胞培養では、培養器を8の字軌跡を描かせるように動作させることで均一に播種する。上記のように回転動作が最もシンプルに構成できるが、回転に限定する必要はなく、様々な並進動作、または回転と並進動作の組み合わせで対応してもよい。

【0026】

図4は図2の細胞培養装置の制御ブロック図、及び複数の細胞培養装置を接続しプラント化した場合のブロック図である。図2の細胞培養装置は、127で示される。ピンチ弁24, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 103, 104と、温度センサ106と、ヒータ108と、ファン65と、しごきポンプ37, 101と、容器移動モータ94, 63と、培養器駆動モータ29と、ピペッタ上下動モータ59と、ピペッタ回転動モータ57と、ピペッタ上下動モータ90と、ピペッタ回転動モータ88と、シャッターモータ50, 81はI/O 120を介してバス121に接続する。また、CCDカメラ31は画像取り込みボード250とI/O 120を介してバス121に接続する。上記バス121には、CPU122、操作卓123、操作器126、メモリ124、コンピュータネットワークドライバ125を接続している。

【0027】

この図4において、細胞培養装置は127で示されるが、外部にコンピュータネットワークを配すれば、複数の細胞培養装置128, 129を接続し、また制御監視装置130を接続すれば、複数の培養装置を離れた所から監視や制御ができるようになる。制御監視装置130は、汎用のパーソナルコンピュータで対応可能である。なお、コンピュータネットワークの場合は、双方向のデータ通信手段であれば特に限定しない。また、単に細胞培養装置の状態を離れた所から認識する目的ならば、片方向のデータ通信手段で良い。このコンピュータネットワークに接続する細胞培養装置の台数は特に限定しない。複数の細胞培養装置を利用する場合、データ通信手段により接続することにより、通常数週間もの長い時間を要す培養期間中、各細胞培養装置の状態を常に遠隔監視できるので、大規模な培養設備には好適である。制御監視装置130の機能は、図5において説明する細胞培養装置の動作を逐次監視し、異常時には外部に信号を発する機能を備える。公知の技術であるため、詳細な説明は省略するが、監視機能は各培養装置が担ってもよいし、制御監視装置130が請負ってもよい。例えば制御監視装置130は、時分割で各細胞培養装置の動作を確認し、細胞各細胞培養装置が異常をおこした場合に、当該細胞培養装置を外部に知らせる方法がもっとも容易である。

【0028】

図5は細胞培養装置の動作を説明するためのフローチャートである。以下、この図5を用いて、さらに図1及至図4を参照し、細胞培養装置の動作を説明する。なお、図4に示すCPU 122、メモリ124、バス121は汎用コンピュータで用いられている技術であるので、以下それらCPU122、メモリ124、バス121の詳細動作は省略し、各アクチュエータの動作のみ説明する。

ステップ1：「スタート」

細胞培養装置127の動作開始であり、操作者が操作卓123の操作器126のスタートスイッチを押す。また、前述した図4に示すように複数の細胞培養装置と制御監視装置がコンピュータネットワークに接続されている場合は、制御監視装置側でスタートスイッチを押すように構成してもよい。なお、この時点では既に培養器38や、各タンク67, 68, 69, 70, 71には薬品が培養装置127にセットされている。

【0029】

ステップ2：「培地注入」

ピンチ弁72を開放し、しごきポンプ37が動作して、培地タンク67内の培地がチューブ21を通して送液する。送液される培地は、矢印J1、矢印Jの経路を通り培養器38に流れ込み、17となる。予め設定された（設定値はメモリ124に記憶されている）培地が注入された

ら、しごきポンプ37の動作を停止し、ピンチ弁72は閉じる。

ステップ3：「容器52の投入」

操作者が操作器の当該スイッチを操作すると、シャッターモータ50が動作し、シャッター51が矢印A方向（上昇方向）にスライドする。所定量上昇後、容器移動モータ63が動作し、ホルダーが矢印B方向（右方向）に移動する。所定量移動後、操作者は培養前細胞を入れた容器52をホルダー62に置く。その後、容器移動モータ63は上記と逆方向に回転し、ホルダー62は矢印B方向（左方向）に移動する。シャッターモータ50が回転し、シャッター51は矢印A方向（下降方向）に移動して、閉じる。

【0 0 3 0】

ステップ4：「ピペッタを駆動させ細胞を培養器38に移送」

容器移動モータ63が小刻みに正逆回転し、容器52内の細胞を懸濁する詳細は述べないが、ホルダー62内部に容器52を振動させるアクチュエータを備えても良い。この動作と前後して、ピペッタ回転動モータ57が動作し、ピペッタアーム55が回転する。次にピペッタ上下動モータ59が動作し、ピペッタアーム55が下降して、容器52内に針53が挿入する。ピンチ弁66が開放し、しごきポンプ37が動作する。これにより、容器52内の培養前細胞は吸いだされ、細胞は矢印J2→J方向へチューブ56を通して、送液される。そして、チューブ21を通り、培養器38に注入される。注入終了後、ピンチ弁66は閉じ、またしごきポンプ37は停止する。

【0 0 3 1】

ステップ5：「培養器をシャッフリングし、均一化・播種」

モータ28が回転し、培養器38に注入した細胞を均一播種のため懸濁する。細胞の均一播種は、過度の細胞密度は細胞の変質を招く恐れがあるため、細胞培養を効率高く行うために必要である。なお、培養前細胞の注入が確認された後にモータ28が回転を始めるのではなく、培養細胞が接着依存性細胞の場合（固形物を認識にてこの固形物に接着することにより培養する細胞）、培養前細胞が培養器38内部に注入されている最中に、モータ28を回転させた方が良い。

【0 0 3 2】

ステップ6：「培養」

このステップで培養前細胞は培養に入ることになるが、培養中は、温度センサ106、ヒータ108によりフレーム30内は培養に適した温度（37℃前後）に制御され、またファン65によりフレーム30内部の大気を攪拌して、温度ムラをなくすようにする。

ステップ61：「培地を排出」

上記ステップ6を実行前に適宜に実行できる。

ピンチ弁24と、ピンチ弁104が開放され、しごきポンプ101が動作して、培養器38内の培地17がチューブ23を通して、廃液タンク102に培地が送液される。送液完了後、しごきポンプ101が停止し、ピンチ弁24と、ピンチ弁104は閉じる。

【0 0 3 3】

ステップ62：「新しい培地を注入」

上記のようにステップ6を実行前に適宜に実行できる。ピンチ弁72が開放し、しごきポンプ37を動作させ、培養器38内に新しい培地を注入する。注入後、ピンチ弁72は閉じ、しごきポンプ37は停止する。

ステップ7：「継代のタイミングか？」

上記培養中において、適宜（予め時間を決めておいてもよいし、操作卓にスイッチを設けて、術者が動作を指示してもよい）に光源34が発光し、CCDカメラ31が培養器38内で培養されている細胞の画像を得る。この段階の細胞は密度が非常に低く、部分的に密な状態（コロニー）を形成する場合が多い。そのコロニーを培養器駆動モータ28の動作によりCCDカメラ31が捉え、計測する。細胞がコンフルエントに到達していなければ、引き続き培養される。その時必要であれば、ステップ61と62を行なってからステップ6に移る。また、コンフルエントであれば、継代のタイミングということになり、次のステップに移る。

【0 0 3 4】

ステップ8：「目標の細胞数か？」

上記CCDカメラ31からの情報を元に細胞数をカウントないし演算する。結果として、予め操作者が設定した細胞数に達していれば、ステップ15に移る。目標細胞数に達していなければ、次のステップ9に移る。

ステップ9：「培地を排出」

ピンチ弁24と、ピンチ弁104が開放され、しごきポンプ101が動作して、培養器38内の培地17がチューブ23を通して、廃液タンク102に培地が送液される。送液完了後、しごきポンプ101が停止し、ピンチ弁24と、ピンチ弁104は閉じる。

【0 0 3 5】

ステップ10：「培養器を緩衝液で洗浄」

ピンチ弁105が開放し、しごきポンプ37が動作して、緩衝液タンク68から緩衝液が培養器38に注入される。注入後、ピンチ弁105が閉じ、しごきポンプ37が停止する。培養器駆動モータ28が回転し、培養器38を回動させ緩衝液を培養器底面に行き渡らせる。その後、ピンチ弁24が開放し、しごきポンプ101が動作して、廃液タンク102に培養器38内の緩衝液を送液する。

ステップ11：「細胞剥離剤を注入」

ピンチ弁73が開放され、しごきポンプ37が動作し、細胞剥離剤タンク69から細胞剥離剤が培養器38に注入される。注入後、ピンチ弁73が閉じ、しごきポンプ37が停止する。培養器駆動モータ28が回転し、細胞剥離剤を培養器底面に行き渡らせる。

【0 0 3 6】

ステップ12：「中和剤を注入」

ここでは中和剤は培地としている。上記細胞剥離剤は様々なものが利用されているが、ここでは培地は血清が含まれるものとして、この血清により中和される細胞剥離剤を想定する。動作は、上記ステップ2と同様で、ピンチ弁74を開放してタンク70から中和剤を注入する。

所定時間経過後（細胞が接着した後）、次のステップ13に移る。

ステップ13：「培養器をシャッフリングし、均一化」

ステップ5と同一なので省略する。

ステップ14：「中和された細胞剥離剤を排出」

ピンチ弁24と、ピンチ弁104が開放され、しごきポンプ101が動102に培地が送液される。送液完了後、しごきポンプ101が停止し、ピンチ弁24と、ピンチ弁104は閉じる。

【0 0 3 7】

ステップ15：「新しい培地注入」

上記ステップ2と同一なので説明は省略する。

ステップ16：「培地を排出」

上記ステップ9と同一なので説明は省略する。

ステップ17：「培養器を緩衝液で洗浄」

上記ステップ10と同一なので説明は省略する。

ステップ18：「細胞剥離剤を注入」

上記ステップ11と同一なので説明は省略する。

ステップ19：「中和剤を注入」

上記ステップ12と同一なので説明は省略する。

ステップ20：「中和された細胞剥離剤を排出」

上記ステップ14と同一なので説明は省略する。

【0 0 3 8】

ステップ21：「ピペッタを駆動させ細胞を容器に移送」

ピペッタ回転動モータ88が動作し、ピペッタアーム85を回転させる。次にピペッタ上下動モータ90が動作し、ピペッタアーム85が下降して、容器84内に針83が挿入される。ピンチ弁24、103が開放し、しごきポンプ101が動作する。これにより、培養器38内の培養後細胞は吸いだされ、細胞は矢印P1方向にチューブ23を通して、送液される。そして、チュー

ブ86を通り、細胞保管容器84に注入される。

ステップ22：「細胞保管容器を装置外に搬出」

シャッターモータ81が動作し、シャッター82が上昇する。所定量上昇後、容器移動モータ94が動作し、ホルダーが矢印G方向に移動する。これによって、操作者は培養された細胞が入った細胞保管容器84を取得できる。

ステップ23：「終了」

操作者は培養前と比較し、コンタミネーションのない純粋な培養細胞が入った容器84を得る。

【0 0 3 9】

図6は図5のステップ5の動作を示す図である。培養器38はこの図6 (a) に示すように正逆回転を繰り返す。例えば、正方向1回、逆方向1回、最後の正方向1回の停止時にはゆっくりと停止させるようにする。すなわち、最初の加速時間と減速時間 (t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5) を短くすることにより、培養器38の培地17は激しく波打ち、懸濁状態になる。さらに、最後の動作の減速時間 (t_6) を長く取ることにより、培地はその慣性により円周方向に流れを継続しながら、その速度を落とし、やがて停止する。これにより細胞は均等に播かれるようになる。図6 (b) は細胞の播種状態を示すシミュレーション図である。色の濃い箇所 (中心付近) は最後の動作 (減速時間 t_6) にて、流れの接線速度が低いので比較的細胞が凝集し、外周部は細胞が薄く播かれる様子を示している。なお、正逆回転の繰り返し数、回転速度、角加速度 (t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6) は、特に限定せず、条件によって培養器38の前面にわたり、均等に細胞を播くこともできる。しかし、例えば上記のように中心付近に細胞を凝集する動作を故意に実現することで、その部分のみ画像観察することによりコンフルエントのタイミング判定には都合がよくなる。すなわち、培養器38の全面にわたり観察する必要がなくなり、また過度に培養することで細胞の品質を損なうことがなくなる。

【0 0 4 0】

(実施例 2)

図7は、上記実施例1に係わる図2の培養器38の変形例を示す。

たとえば4つの培養器をロータ22に回転中心が4つの培養器の中心となるように乗せる。この図の培養器170は、概ね同一の円柱形状に形成されており、チューブ接続部材174によりチューブ171で接続されている。このチューブ171は、前記図2のチューブ21と同一機能を果たすものである。175は、古い培地を排出するチューブ接続部材である。培養器170はこの図では4ヶとしたが、特に4ヶに限定せず、2ヶ、3ヶ、6ヶと自由に選択してよい。

また、培養器を重ねても良い。この図7のように培養器を複数に分けることにより、培養面積を自由に変更できる。これにより、細胞が接着系の細胞 (例えば間葉系幹細胞) では、培養可能な細胞数は面積と比例関係にある場合が多く、細胞培養における細胞数の調整が可能となる。なお、動作は図5と同一であり、矢印Mの様にシャッフリングすることにより、培養器170内の培地は矢印Qの方向に最終的に流れることになって、培養器170内の細胞は均一に播かれる。

【0 0 4 1】

(実施例 3)

図8は、上記実施例2に係わる図2の培養器38の変形例を示す。

細胞は培養時、その細胞種によって異なるが、概ねコロニー状に増える。

したがって、コンフルエントになったら、より広い面積の、比較的清浄な面に播種、つまり継代することが必要である。

この図8に示す培養器167, 168, 169は、上記特性が顕著な場合の細胞培養に適用して好適な培養器である。167の培養器は、概ね円形のシャーレ構造をしており、上面には供給チューブ182 (図2の供給チューブ21と同じ機能) が接続される。168の培養器は、培養器167とほぼ同じ外囲器構造をしているが、内部に培養補助板が1枚供えられている。169の培養器は、培養器167とほぼ同じ外囲器構造をしているが、内部に培養補助板が2枚供えられている。この培養器169の底面には廃液チューブ185が接続される。各々の培養器167, 168

、169は接続チューブ183、184で接続され、途中ピンチ弁186、187、188で送液を制御する。上記培養器とピンチ弁は図示を省略するが、図2に示すロータ22に固定される。図8(b)は回転中心軸との位置関係を示す図であり、図に示すように回転中心軸Tより大幅にずらしてもよく、矢印Rにて示す方向にシャッフリングすることにより培養器167、168、169内の細胞は均一に播かれる。

【0042】

この図8の培養器167、168、169を用いた細胞培養装置の動作は、前述までの培養器と大きな差異はないが、培養器が3ヶとなり、またピンチ弁が2ヶ増えている。図9は図8の培養器を用いた細胞培養装置の動作を説明するためのフローチャートである。以下、前記図5と動作が似ているので図5との相違点を説明する。

【0043】

図5にて説明した動作は、継代時に培地を排出（ステップ9）、培養器を緩衝液で洗浄（ステップ10）、細胞剥離剤を注入（ステップ11）、中和剤を注入（ステップ12）、培養器をシャッフリングし、均一化・播種（ステップ13）、中和された細胞剥離剤を排出（ステップ14）、新しい培地を注入（ステップ15）であった。すなわち、継代時には新しい培養器に移し変えることなく、コロニー状に増えた細胞をその場所で培養器をシャッフリングすることにより均等に播種し、再度目標の細胞になるまで培養するというものであった。図8の培養器ではステップ12の後に、ステップ130の「下段の培養器への播種」を備えている。

【0044】

すなわち、培養器167でコンフルエントになると、その下の培養器168に細胞を送液により移し変える。この培養器168でコンフルエントになると、その下の培養器169に細胞を送液により移し変える。各々の培養器に注入する培地量は、継代毎に培地量を多くし、培養補助板での培養ができるようにする。すなわち、初回の培養において培地量は、培養器167において培養器本体180の底面のみ培養する量とする。1回の継代後の培養は、培養器168において培養補助板189が漬かる程度の培地量とする。これにより、細胞は培養器本体180と、培養補助板189の両方で培養できるようになる。2回の継代後の培養は、培養器169において培養補助板190と培養補助板191が漬かる程度の培地量とする。これにより、細胞は培養器本体180と、培養補助板190と、培養補助板191の3枚で培養できるようになる。培養補助板が漬かる量とすることで、培養器168は培養器167に対して約2倍、培養器169は培養器167に対して約3倍となる。以下、ピンチ弁の動作を下記する。

【0045】

- (1) 初回の培養：培地、緩衝液、細胞剥離剤、中和剤を排出する時にピンチ弁186、187、188を開放する。
- (2) 継代1回後の培養：培地、緩衝液、細胞剥離剤、中和剤を注入する時にピンチ弁 186を開放する。また、培地、緩衝液、細胞剥離剤、中和剤を排出する時にはピンチ弁187、188を開閉する。
- (3) 継代2回後の培養：培地、緩衝液、細胞剥離剤、中和剤を注入する時にピンチ弁186、187を開放する。また、培地、緩衝液、細胞剥離剤、中和剤を排出する時にはピンチ弁188を開閉する。

【0046】

以上の説明において、培養器の個数、各培養器の形や大きさは限定しない。楕円や矩形としてもよく、各々の大きさを変えてもよい。また培養補助板の枚数も限定しない。この図8に示す実施例においては、培養器は全体的に小型化でき、しいては装置の小型化を実現する。なお、278、279、282、283、284、285は鏡である。280はCCDカメラ、281は光源、286はフィルターである。詳細な説明は省略するが、これらCCDカメラ280、光源281、フィルター286を280のようにユニット化し、図示を略した駆動機構（例えば、モータと送りねじで構成）により矢印V方向に移動することによって、培養器が多層構造となっても、CCDカメラを鏡を利用し、横から観察できるようになる。

【0047】

(実施例 4)

図10は、実施例3に係わる図8の培養器の変形例を示す断面図である。図8の培養器と異なるのは、継代時に新しい培養器に移し変えることなく、図2に示す培養器38と同様に扱える。構造的には、概ね円形のシャーレ構造をしており、上面には供給チューブ197（図2の供給チューブ21と同じ機能）が接続される。培養器本体195には蓋199が被され、内部に培養補助板201、202が2枚供えられている。動作の概要は、図8と同じであるが、継代毎に培地量を多くし、培養補助板での培養ができるようにする。すなわち、初回の培養において培地量は、培養器本体195の底面のみ培養する量とする。1回の継代後の培養は、培養補助板201が潰かる程度の培地量とする。これにより、細胞は培養器本体195と、培養補助板201の両方で培養できるようになる。2回の継代後の培養は、培養補助板202が潰かる程度の培地量とする。これにより、細胞は培養器本体195と、培養補助板201と、培養補助板202の3枚で培養できるようになる。利点としては、図2の培養器38と比べて、前述図8と同様に小型化を実現できる点にある。以上の説明において、培養器の個数、各培養器の形や大きさは限定しない。楕円や矩形としてもよく、各々の大きさを変えてもよい。また培養補助板の枚数も限定しない。この図10に示す実施例においては、培養器は全体的に一層小型化でき、しいては装置の小型化を実現する。

【0048】

(実施例 5)

図11は細胞を均一に播種するための手段を示した図で、上記実施例に置換して好適な効果を生む。図11(a)において、300は培養器本体、301は培養器本体の蓋、302は、供給用チューブ接続部材、307、308、309、310は磁石、381は302からの液体の落下の衝撃を和らげて細胞へのダメージを防ぐ傾斜部である。これら磁石は、図2においてフレーム30に固定される。303、304、305、306は、培養器本体300（図2の培養器38と同一）の中に入れられる磁性材の表面にコーティング（細胞無毒性の高分子プラスチック、セラミック、チタンが好適）して得た球状部材である。培養器140が回転するとそれに伴い球状部材303、304、305、306が培養器本体300内を転がり、内部の培地が攪拌されることにより、細胞の均一播種が可能になる。図11(b)は、312は培養器本体、313は培養器本体の蓋、314供給用チューブ接続部材、315は培養器本体300（図2の培養器38と同一）の中に入れられる磁性材の表面をコーティング（細胞無毒性の高分子プラスチック、セラミック、チタンが好適）した棒状部材、381は上記と同じである。この図11(a)と、図11(b)の効果は同様である。

【0049】

(実施例 6)

図12は、上記実施例における培養器とチューブの接続方法を示した図である。図2では培養器、チューブ、リザーバタンクなどは予め接続されているものとして説明したが、この図12では切断されたチューブを接続して培養するものである。培養器325（図2にては38）には供給チューブ320と、廃液チューブ326が接続されている。各々には例えばゴムのような柔軟材にて栓321、327がされている。実際に培養に入る前に、針322、328を有した供給チューブ323、廃液チューブ329を接続する（接続前にアルコールなどで滅菌するとよい）。このようにすることにより、長いチューブが接続された培養器を装置にセットする際にチューブの取り回しが楽になり、操作性が上がる。なお、培養前細胞を注入する際、シリンジ324を使えば、直接培養器325に細胞を入れることができる。また、供給チューブ323、廃液チューブ329を培養器325に予め接続せずに、直接ゴム栓321、327を取り付けても良い。

【0050】

(実施例 7)

図13は、上記実施例における培養装置の一部の滅菌法を示す図であり、培養器38と各タンク71、70、69、68、67、102がチューブにより接続された状態を示す図で、滅菌バッグ（外気との接触を防ぐ材質で作られたものであり、一般に利用されている）に矢印Sに示すように丸ごと封入し、ガンマ線などの滅菌に供する。このように細胞に触れるものは全

て滅菌することにより、培養中はチューブを外さなくてすむことから、コンタミネーションのリスクは皆無となる。

【図面の簡単な説明】

【0 0 5 1】

【図 1】 本発明の実施例1に係わる細胞培養装置の概略構成を示すブロック図。

【図 2】 本発明の実施例1に係わる適用してなる細胞培養装置の機構部の詳細図。

【図 3】 (a) は図2の培養器38の培養器の平面透視図、(b) は略断面図と変形例を示した図。

【図 4】 図2の細胞培養装置の制御ブロック図。

【図 5】 図2の細胞培養装置の動作を説明するためのフローチャート。

【図 6】 (a) は図5のステップ5の回転動作を表す図であり、(b) は均一性を生じる様子を示した図。

【図 7】 (a) は本発明の実施例2に係わる培養器の平面透視図、(b) は略断面図。

【図 8】 (a) は本発明の実施例3に係わる培養器の略断面図、(b) は斜視図である。

【図 9】 本発明の実施例3に係わる細胞培養装置の動作を説明するためのフローチャート。

【図 1 0】 本発明の実施例4に係わる培養器の略断面図。

【図 1 1】 (a) は本発明の実施例5に係わる培養器の略断面図であり、(b) は変形例を示す図。

【図 1 2】 本発明の実施例6に係わる培養器とチューブの接続方法を示した図。

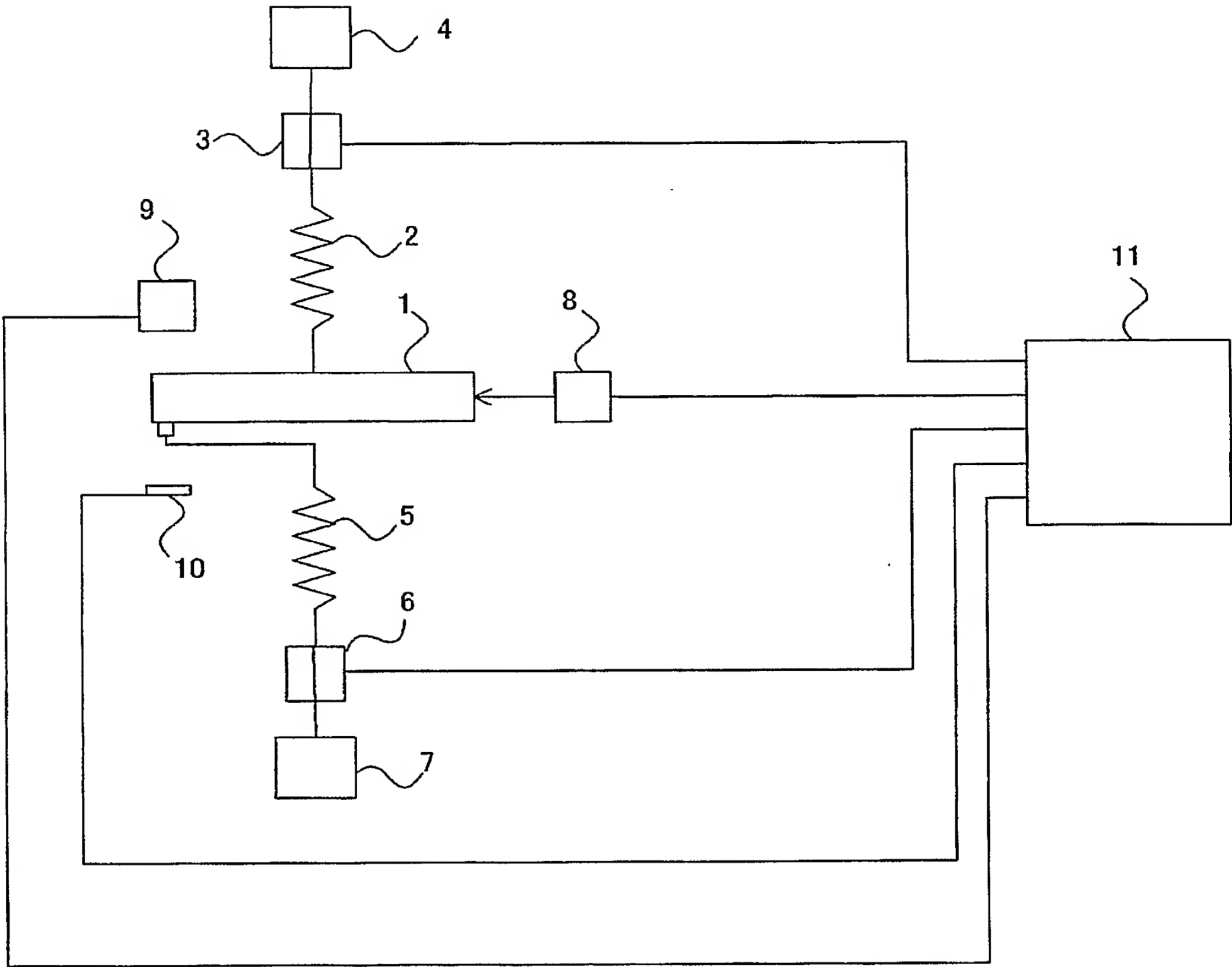
【図 1 3】 本発明の実施例7に係わる滅菌法を示す図。

【符号の説明】

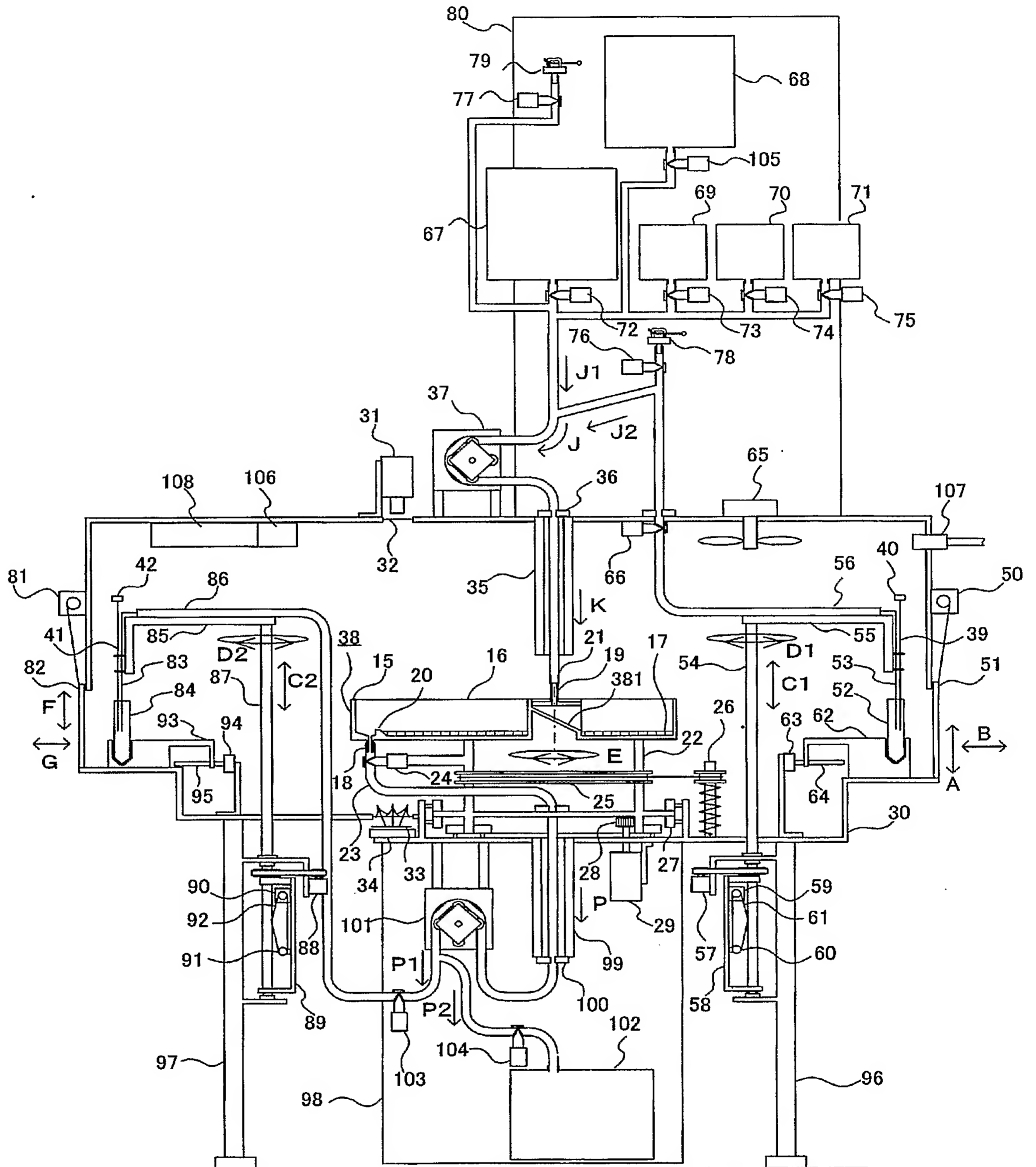
【0 0 5 2】

1 培養器、3 ポンプ、4 リザーブタンク、2 可撓性管部材、7 廃液タンク、6 ポンプ、5 可撓性管部材、8 駆動手段、10 光源、9 カメラ、11 システム コントローラ

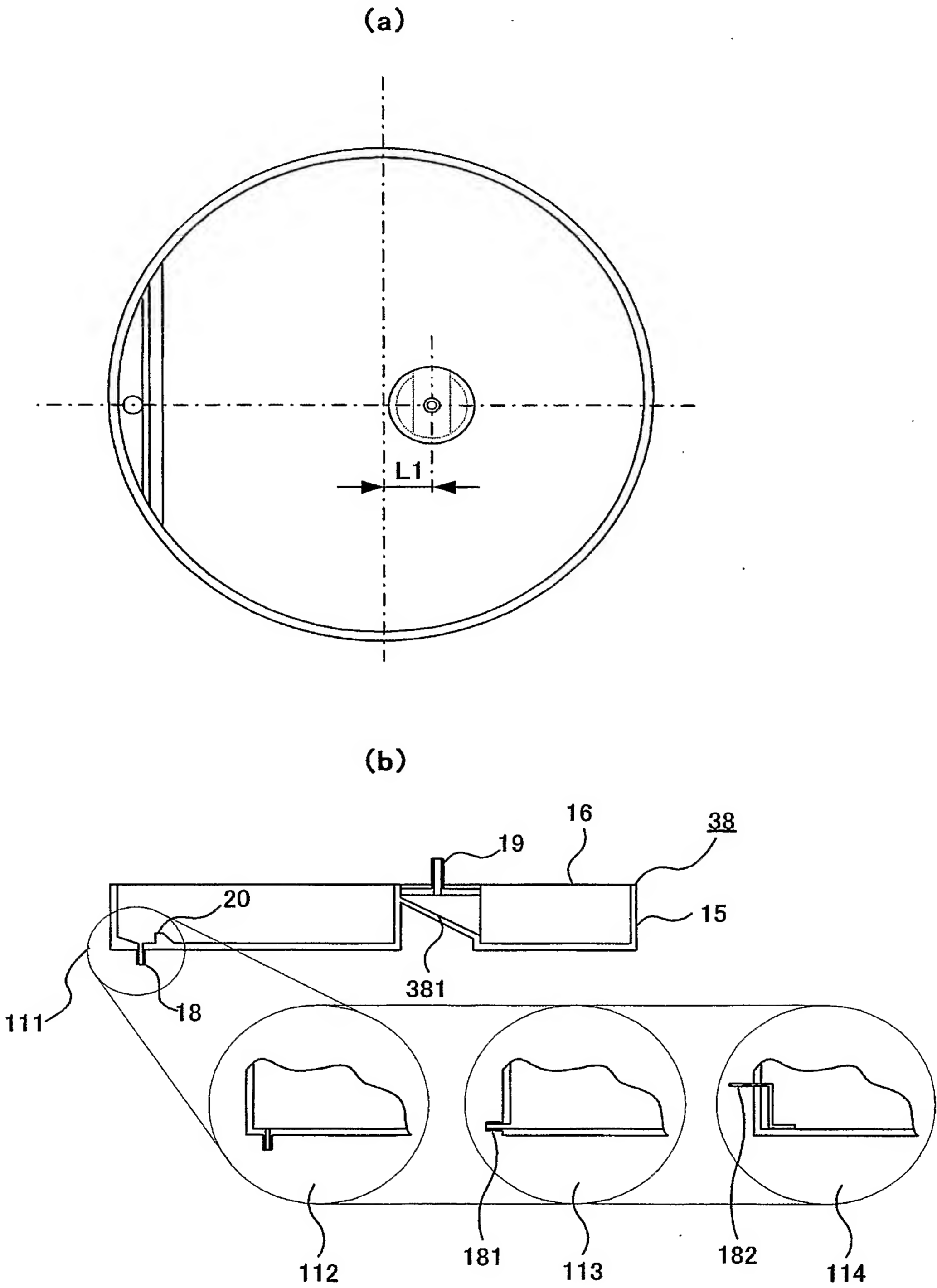
【書類名】 図面
【図 1】



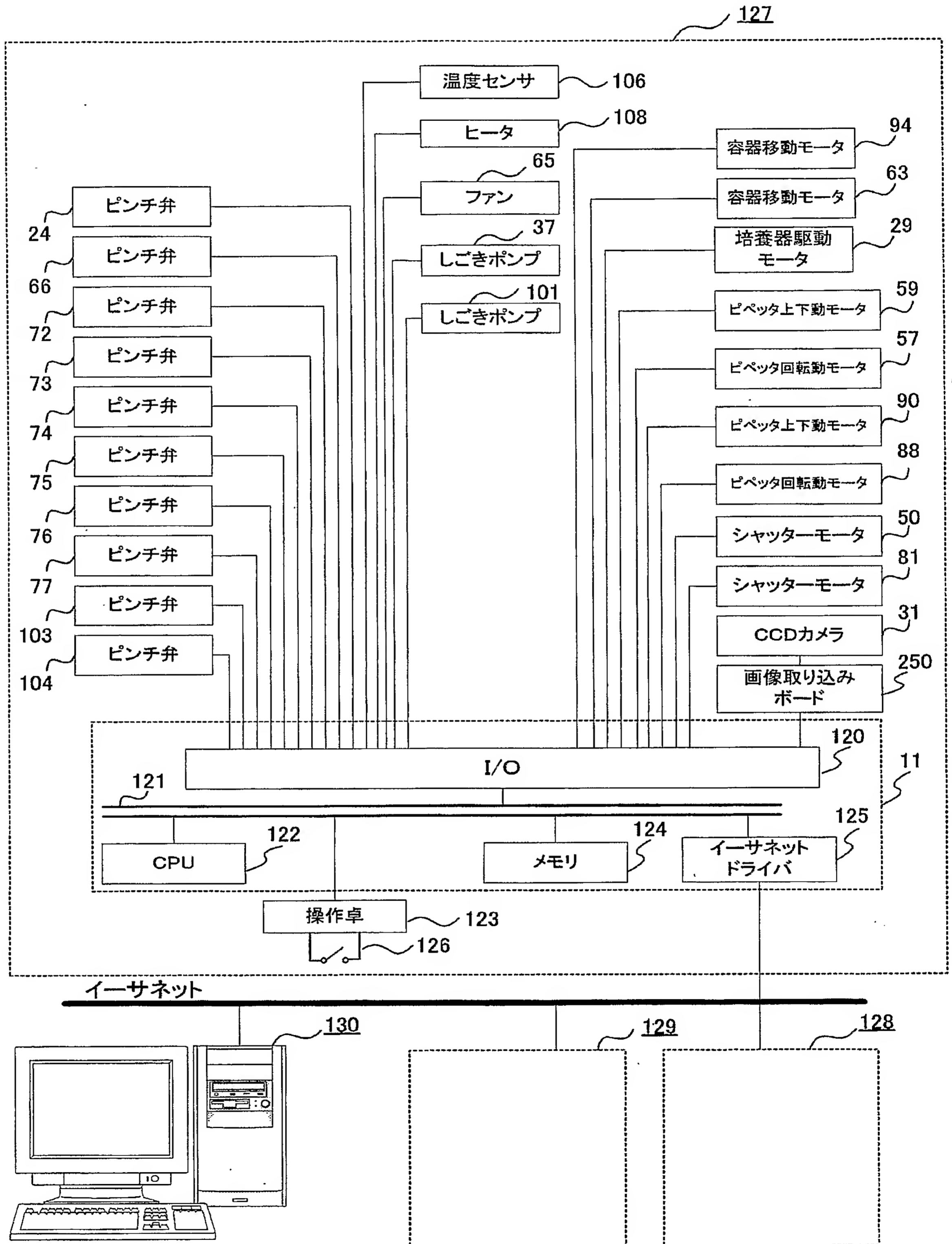
【図 2】



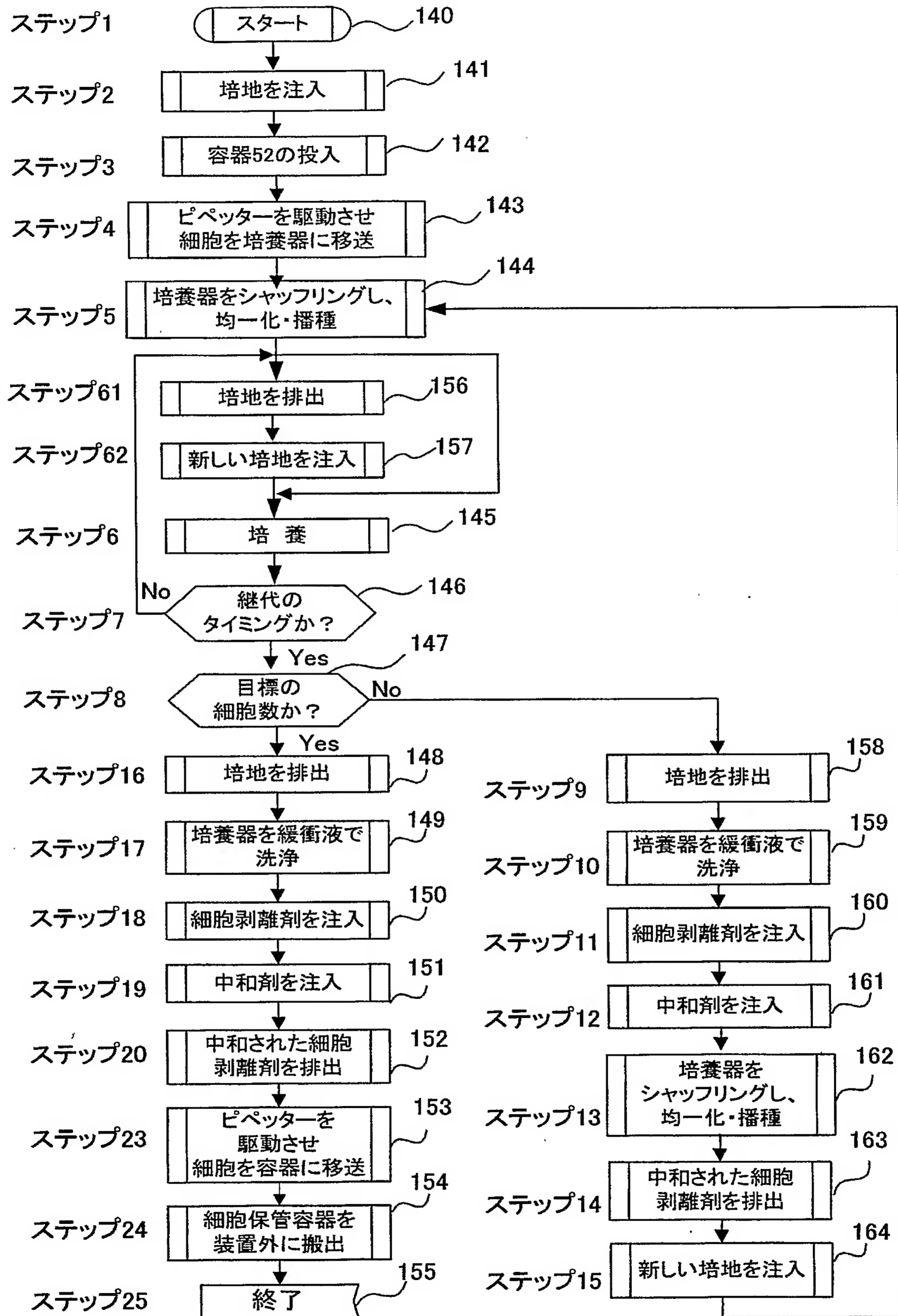
【図 3】



【図 4】

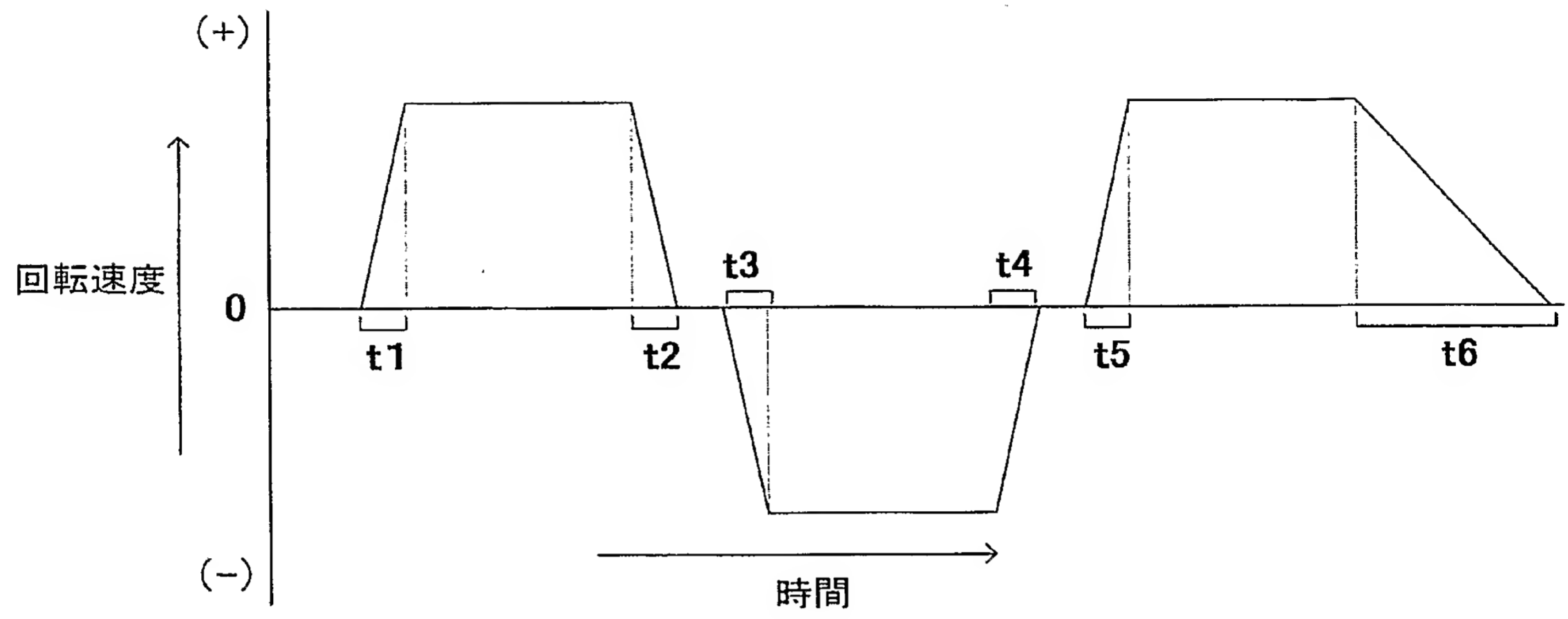


【図 5】

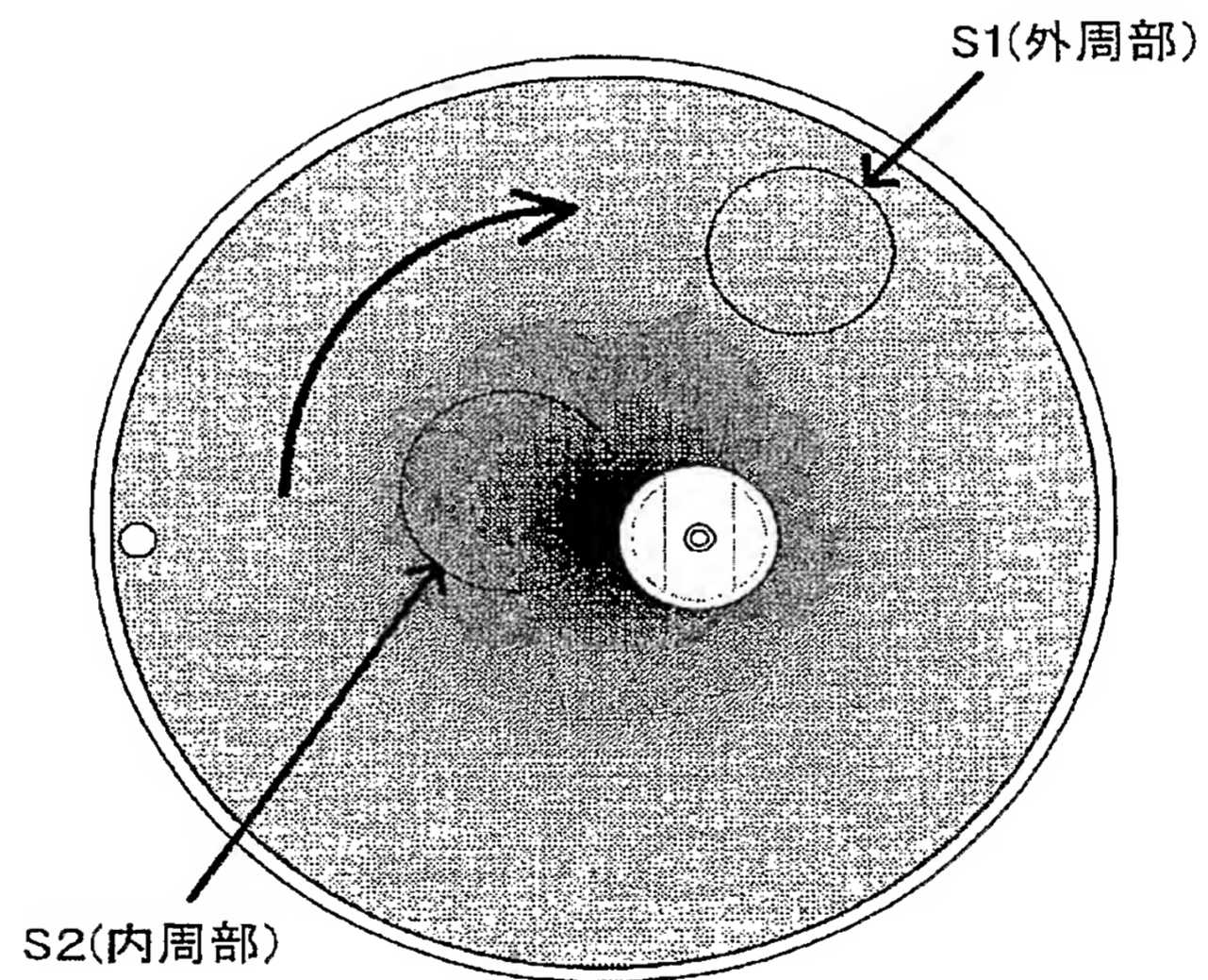


【図 6】

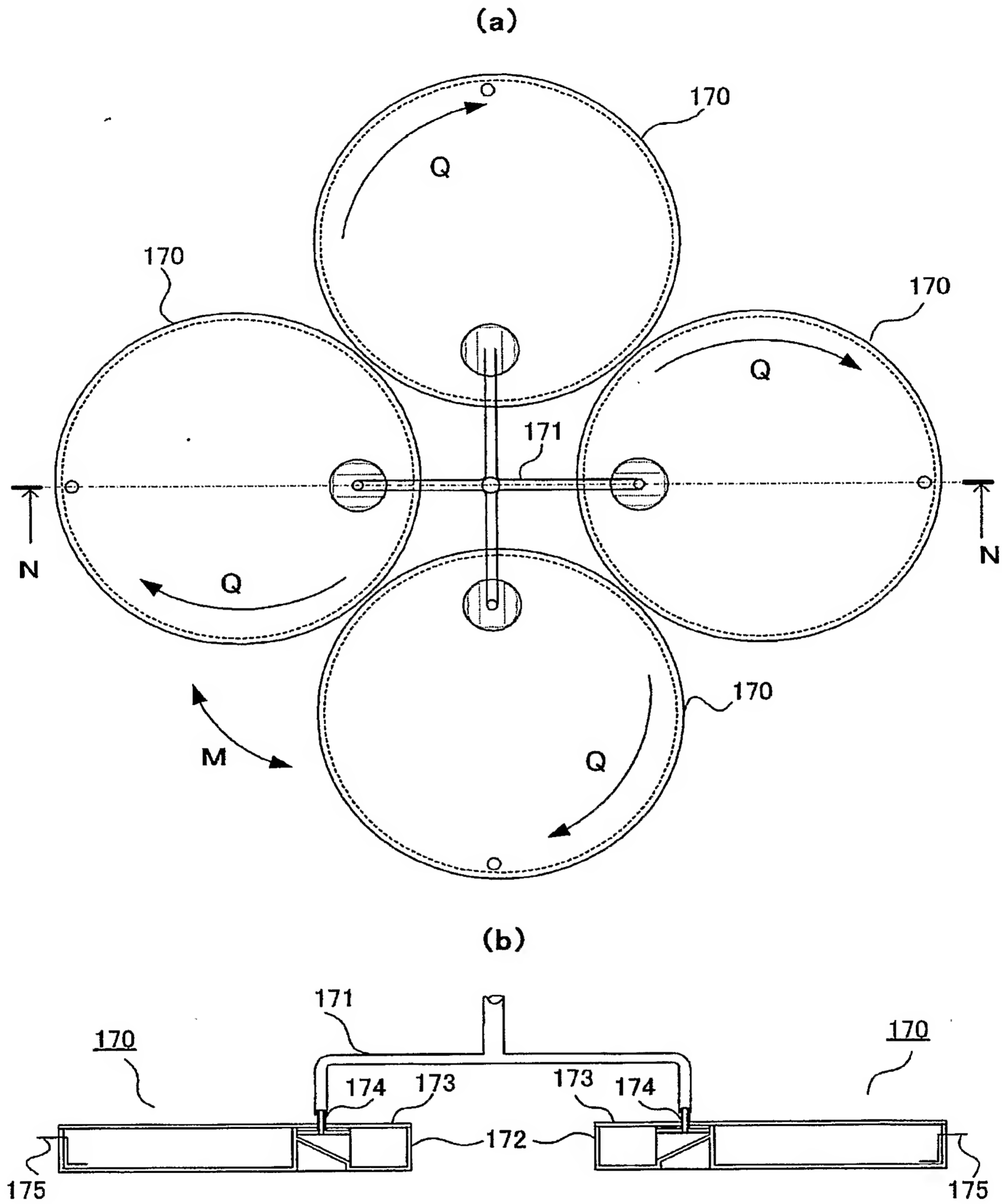
(a)



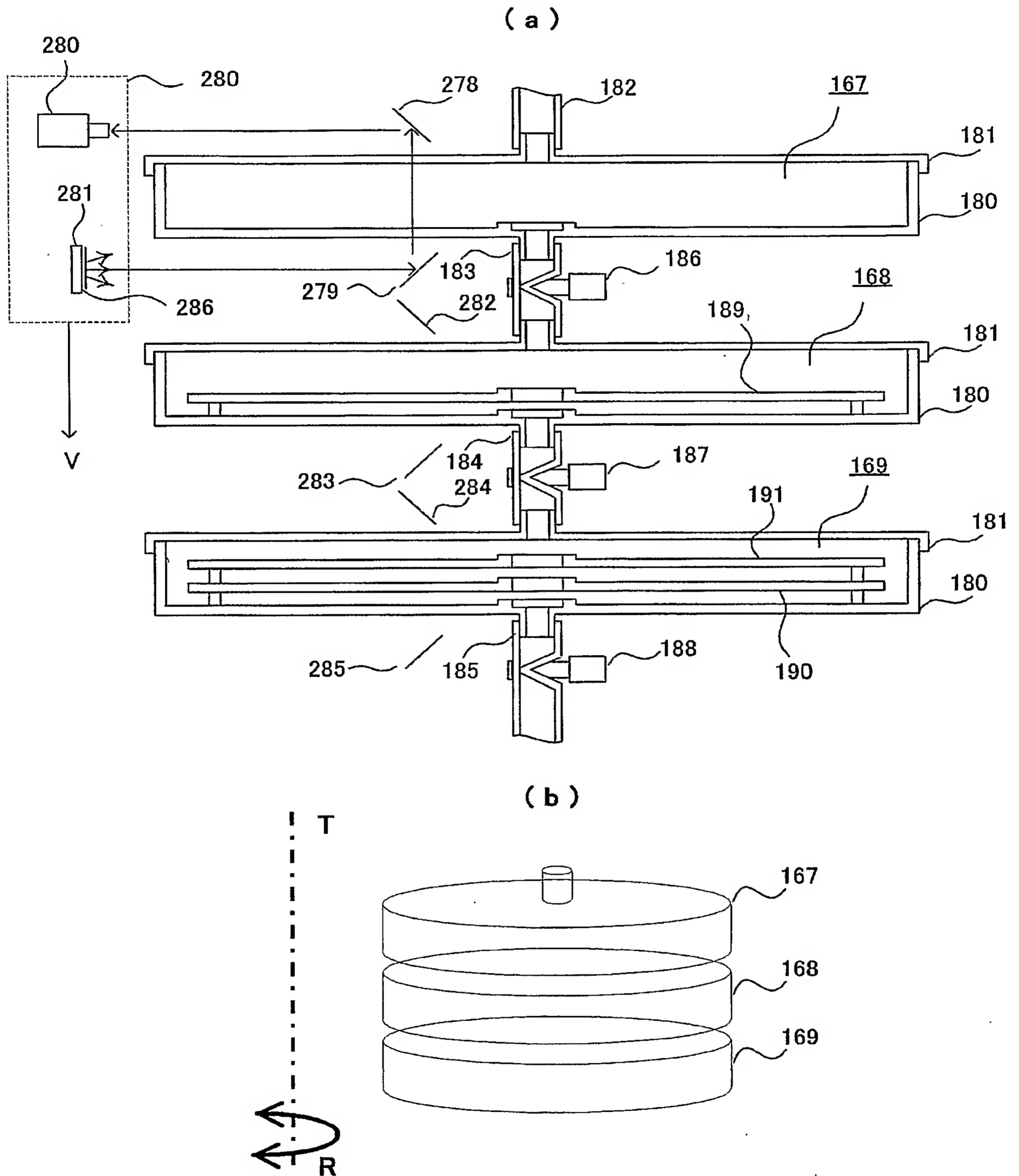
(b)



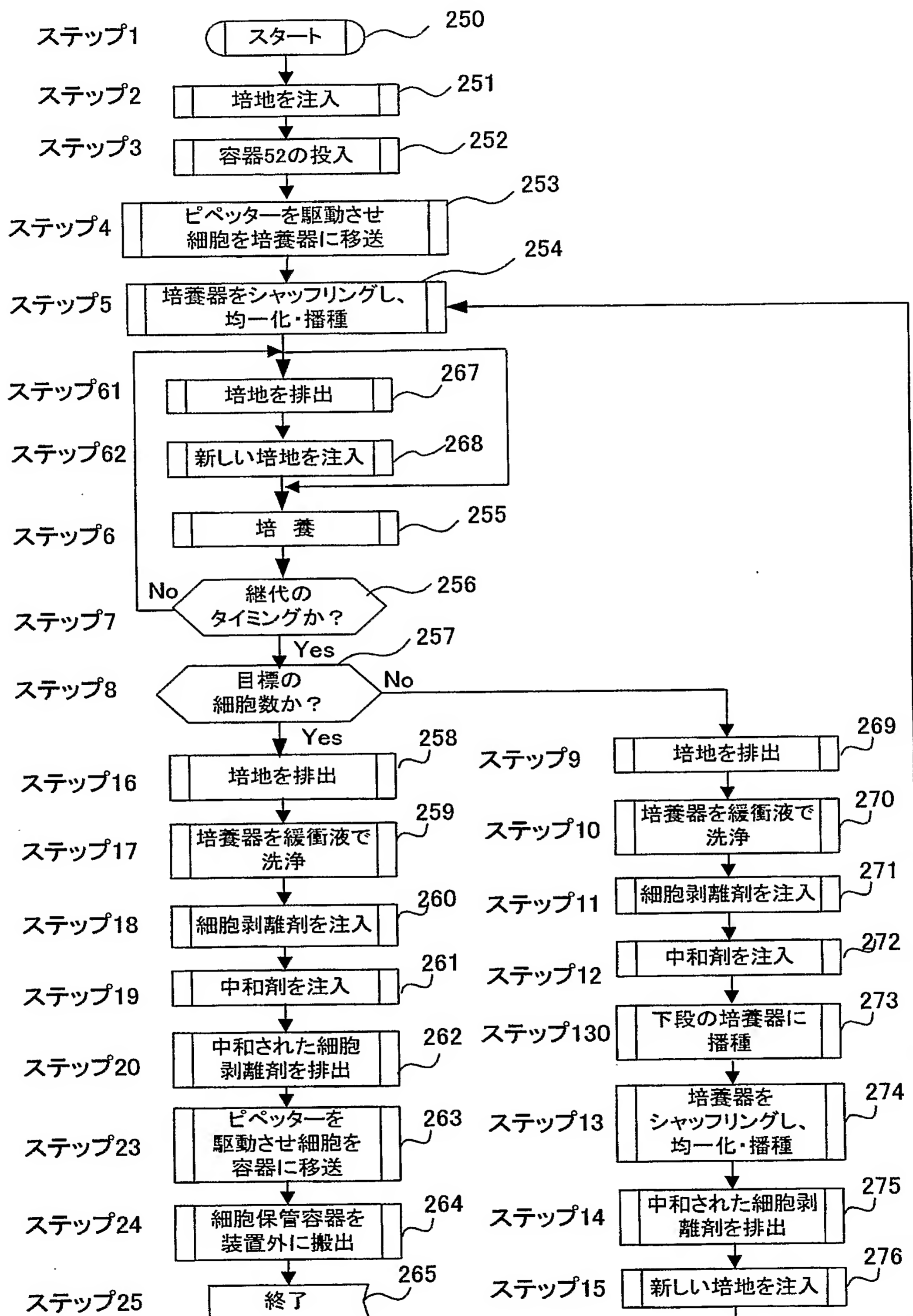
【図 7】



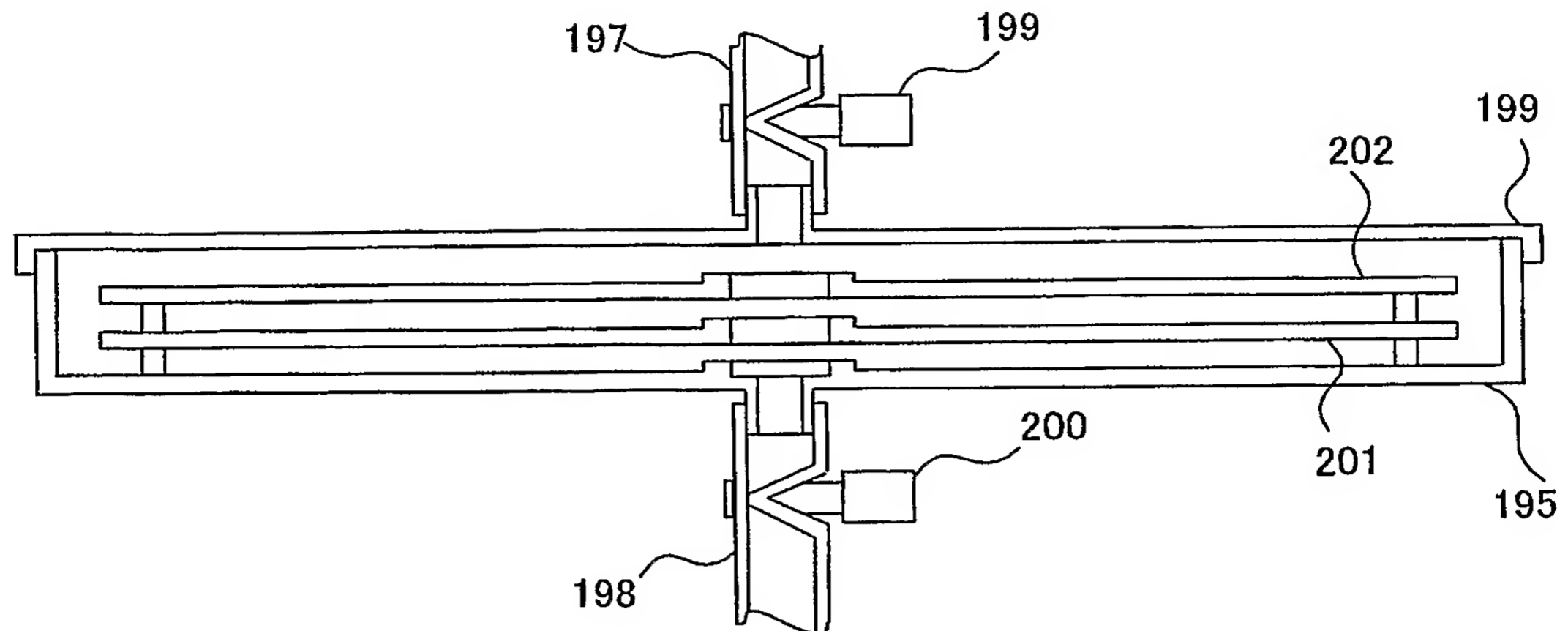
【図 8】



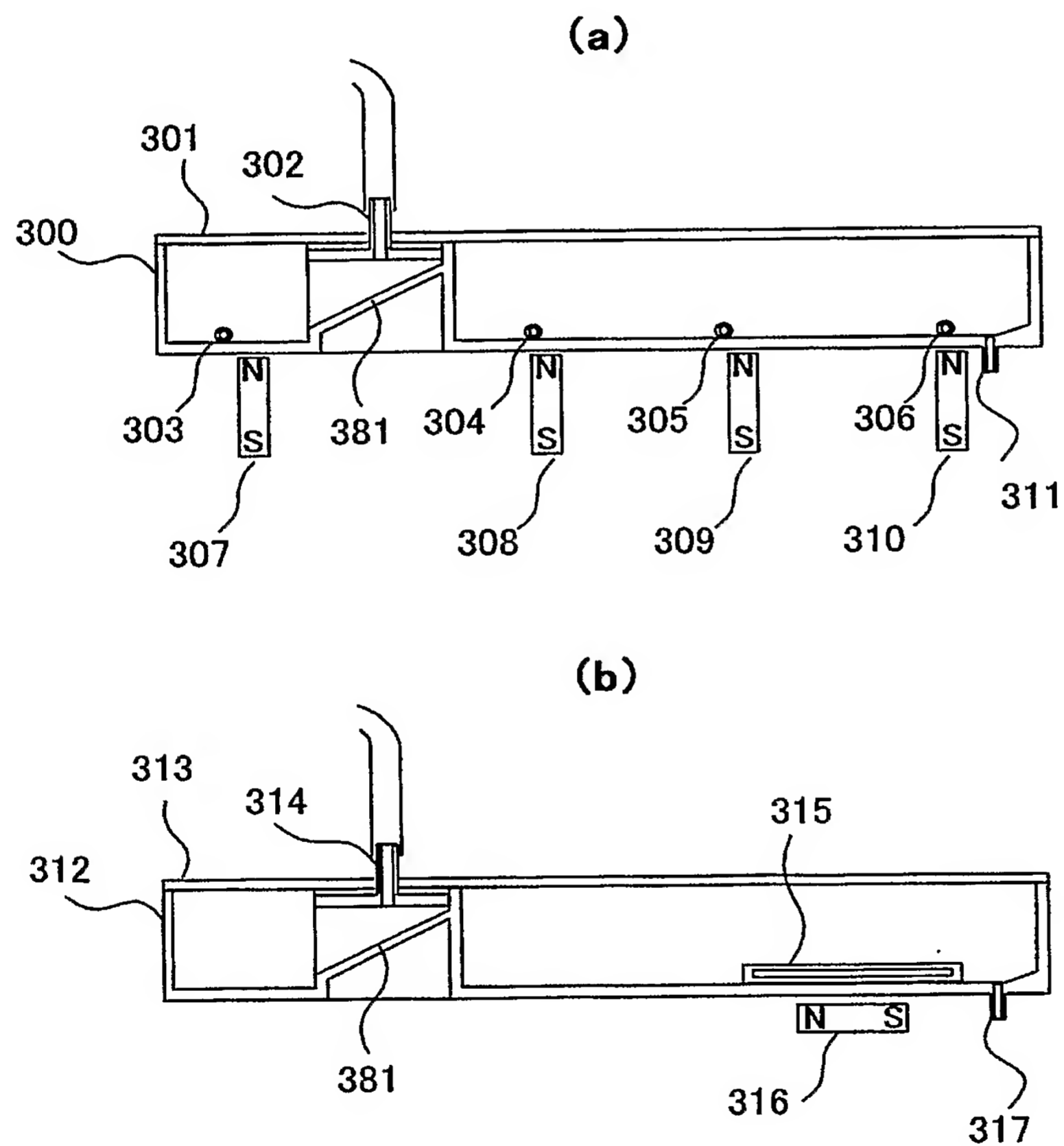
【図 9】



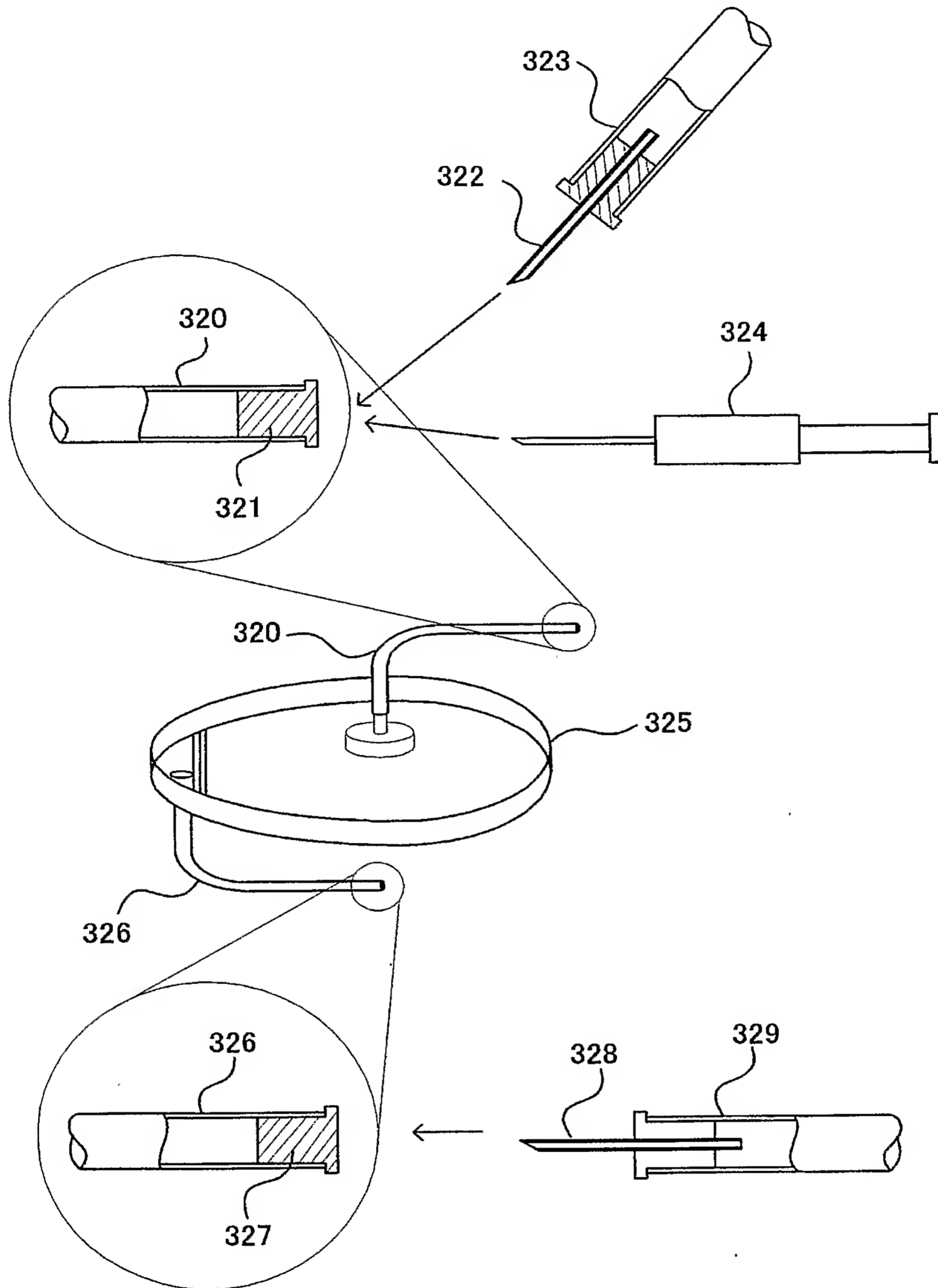
【図 10】



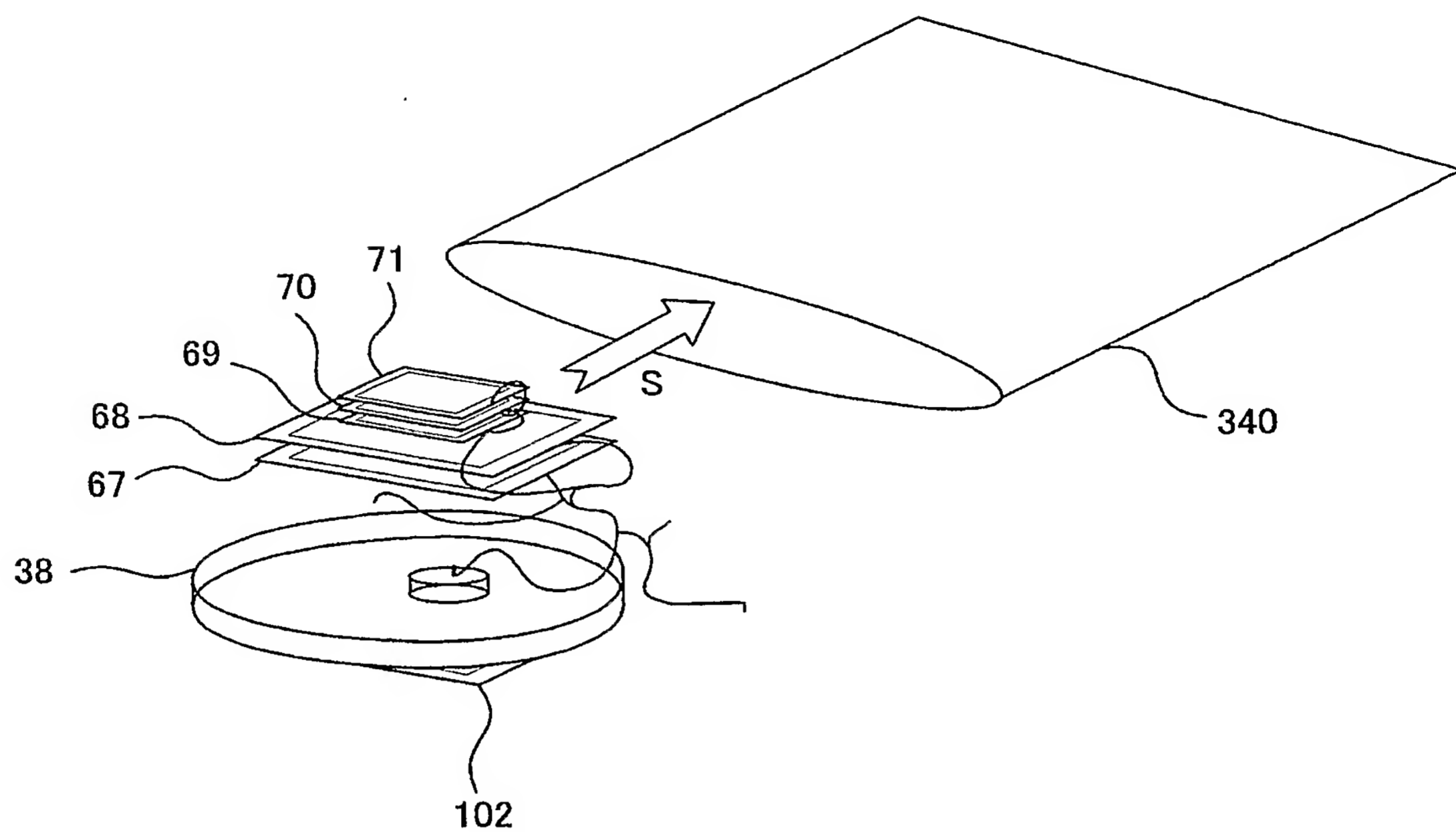
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コンタミネーションの心配がない細胞培養装置を提供する。

【解決手段】 細胞を培養する培養器 1 と未使用の薬品を入れたりザーブタンク 4、もしくは上記培養器 1 と使用後の薬品を入れる廃液タンク 7 の一方を少なくとも部分的に変位可能に形成した管部材 2, 5 で接続し、培養器を回動させる駆動手段 8 とで構成する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 4 2 0 5 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 5 3 4 9 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区内神田 1 丁目 1 番 1 4 号

氏 名 株式会社日立メディコ